

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire N13B2263PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 99/ 02964	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/11/1999	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 21/12/1998
Déposant NEUROTECH (S.A.) et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 2 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

- ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
- ☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

PREPARATIONS DE CELLULES DE MAMMIFERE EVENTUELLEMENT TRANSFECTEES AVEC UN GENE CODANT POUR UNE SUBSTANCE ACTIVE ET LES CONTENANT

5. En ce qui concerne l'abrégé,

- ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
- ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

- ☐ suggérée par le déposant.
- ☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
- ☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 99/02964

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K48/00 C12N5/10 A61P25/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 40139 A (NEUROTECH SA ; ADAMSON PETER (GB); GREENWOOD JOHN (GB); LUND RAYMON) 30 octobre 1997 (1997-10-30) cité dans la demande	
A	WO 96 11278 A (CHAUVEROT NATHALIE ; TCHELINGERIAN JEAN LEON (FR); ADIM (FR); ROUX F) 18 avril 1996 (1996-04-18) cité dans la demande	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02964

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9740139	A	30-10-1997	FR 2747690 A	24-10-1997
			AU 2704197 A	12-11-1997
			CA 2225520 A	30-10-1997
			EP 0833895 A	08-04-1998
			JP 11508142 T	21-07-1999
			NZ 329360 A	28-05-1999
W0 9611278	A	18-04-1996	FR 2726005 A	26-04-1996
			AU 3657595 A	02-05-1996
			CA 2202066 A	18-04-1996
			EP 0787197 A	06-08-1997
			JP 10507074 T	14-07-1998
			NZ 293994 A	25-02-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dern. internationale No

PCI/FR 95/01313

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00 C07K14/48 C07K14/075
C07K14/82

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol. 91, no. 21, 11 Octobre 1994 WASHINGTON US, pages 9695-9699, LAL, B. ET AL. 'Endothelial cell implantation and survival within experimental gliomas' voir le document en entier ---	1, 3-5, 7, 8, 12-16, 18, 20
Y	WO, A, 93 06222 (CNRS) 1 Avril 1993 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-20
Y	WO, A, 89 05345 (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 15 Juin 1989 voir page 31, ligne 22 - page 32, ligne 3; revendications ---	1-20
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 Février 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01.03.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO,A,94 10305 (SANDOZ-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H.) 11 Mai 1994 voir le document en entier ---	1-20
Y	WO,A,93 13807 (GEORGETOWN UNIVERSITY) 22 Juillet 1993 voir page 2, ligne 4 - page 5, ligne 15; revendications 1-3,6-8,11,12,16 ---	1-20
A	WO,A,92 17569 (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES USA) 15 Octobre 1992 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,92 07573 (SOMATIX THERAPY CORPORATION) 14 Mai 1992 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,93 14193 (YALE UNIVERSITY) 22 Juillet 1993 voir le document en entier ---	1
A	IN VITRO CELL. DEV. BIOL., vol. 27A, Octobre 1991 pages 771-778, DURIEU-TRAUTMANN, O. ET AL. 'Immortalization of brain capillary endothelial cells with maintenance of structural characteristics of the blood-brain barrier endothelium' voir le document en entier ---	1
A	JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY, vol. 157, 1993 pages 41-51, VICART, P, ET AL. 'Cell adhesion markers are expressed by a stable human endothelial cell line transformed by the SV40 Large T antigen under vimentin promoter control' voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière internationale No
PCT/FR 95/01313

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO-A-9306222	01-04-93	FR-A- 2681609	26-03-93
WO-A-8905345	15-06-89	AT-T- 110108	15-09-94
		DE-D- 3851153	22-09-94
		DE-T- 3851153	05-01-95
		EP-A- 0391960	17-10-90
		JP-T- 3505036	07-11-91
WO-A-9410305	11-05-94	AU-B- 5440494	24-05-94
		CA-A- 2143489	11-05-94
		EP-A- 0669977	06-09-95
		FI-A- 952088	02-05-95
		NO-A- 951628	03-07-95
WO-A-9313807	22-07-93	AU-B- 3429993	03-08-93
WO-A-9217569	15-10-92	AU-B- 1765992	02-11-92
		EP-A- 0578769	19-01-94
		JP-T- 6509467	27-10-94
WO-A-9207573	14-05-92	AU-B- 659824	01-06-95
		AU-B- 1266692	26-05-92
		AU-B- 656544	09-02-95
		AU-B- 9017591	26-05-92
		CA-A- 2095153	01-05-92
		CA-A- 2095256	01-05-92
		EP-A- 0568537	10-11-93
		EP-A- 0556345	25-08-93
		JP-T- 7503121	06-04-95
		JP-T- 6503968	12-05-94
		WO-A- 9207943	14-05-92
WO-A-9314193	22-07-93	US-A- 5336615	09-08-94
		AU-B- 3478193	03-08-93

THIS PAGE BLANK (USPTO)

091868663

5000
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference N13B2263PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR99/02964	International filing date (day/month/year) 30 November 1999 (30.11.99)	Priority date (day/month/year) 21 December 1998 (21.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 48/00		
Applicant NEUROTECH (S.A.)		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 20 June 2000 (20.06.00)	Date of completion of this report 23 March 2001 (23.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR99/02964

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-28, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 1-16, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the drawings:
pages 1/4-4/4, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02964

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	2, 7-9, 11-16	YES
	Claims	1, 3-6, 10	NO
Inventive step (IS)	Claims	2, 7-9, 11-13	YES
	Claims	1, 3-6, 10, 14-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Cited documents

The present notification refers to document D1 cited in the search report.

D1: WO 96 11278 A (1996-04-18)

The present notification also refers to document D2 cited in the present application (see copy attached).

D2: WO 93 13807 A1 (1993-07-22)

Novelty and inventive step (PCT Article 33(2) and (3))

1. The present application relates to a preparation of immortalised, non-tumour-producing mammalian brain or retinal, endothelial or epithelial cells for systemic delivery to a patient, characterised in that it does not include an aggregate of said cells having a size likely to cause transient or permanent dysfunctions in said patient. The present application further relates to a pharmaceutical composition containing said cells and useful in a method for gene therapy of a central nervous system

THIS PAGE BLANK (USPTO)

disease.

2. Document D1 relates to immortalised, non-tumour-producing mammalian brain endothelial cell lines as well as compositions containing same, advantageously for intravenous or intra-arterial delivery to a patient (see the abstract, page 1, lines 5-11, page 3, lines 1-25, page 6, lines 7-17). No adverse effect of said lines is mentioned (see page 5, lines 22-26). Therefore, document D1 anticipates the subject matter of **claims 1, 3-6 and 10** (PCT Article 33(2)). Furthermore, document D1 mentions the therapeutical use of said cell lines, particularly for treating neurological diseases (see the abstract, lines 2-3, page 1, lines 8-11, page 5, lines 26-29). Therefore, this document is also prejudicial to the inventive step of **claims 14-16** (PCT Article 33(3)).

Document D2 describes, as mentioned in the present application (page 5, lines 10-14), the intravenous injection via the mouse tail vein of endothelial cells from genetically modified non-tumour-producing mice, and does not mention the observation of an adverse effect linked to the formation of cell aggregates (see the abstract, page 11, lines 11-14, page 12, lines 18-24, page 19, lines 9-14, claims 1-3). Therefore, document D2 anticipates the subject matter of **claims 1, 4, 5 and 10**.

3. It should be noted that the objections raised above are the result of the fact that the wording of claim 1 is imprecise and does not include the essential technical feature of the invention whereby the invention could be unambiguously differentiated from

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the prior art as far as novelty is concerned (see the objection in Box VIII, paragraph 1(ii)).

If the applicant were to amend claim 1 by incorporating the essential technical feature of the invention, as suggested in Box VIII, paragraph 1(ii), then the subject matter of said claim would be considered to be novel and inventive (PCT Article 33(2) and (3)).

Indeed, the underlying technical problem of the present application is that of providing a mammalian cell preparation containing a large number of cells that do not induce transient or permanent dysfunctions in a patient following systemic delivery thereto. The solution to said problem, as proposed in the present application, involves the use of a cell preparation characterised in that it does not include an aggregate of said cells having a size greater than around 200 microns, preferably greater than 50 microns and most preferably greater than 30 microns.

None of the prior art documents made available to the IPEA mentions the adverse effect of systemically delivered cell compositions owing to the presence of cell aggregates, or suggests the use of a cell preparation including cell aggregates having a limited size. Therefore, the IPEA is of the opinion that, in the light of the available prior art, it would not be obvious for a person skilled in the art to think of using a cell preparation characterised in that it does not include an aggregate of cells having a size greater than around 200 microns, preferably greater than 50 microns and most

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02964

preferably greater than 30 microns, as a means of solving the stated problem. It follows that the subject matter of the present application would involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The claims contain numerous definitions that are not acceptable under PCT Article 6.
 - (i) The phrase 'gene coding for an active substance' in **claims 1, 14 and 16** is imprecise and casts doubt on the desired scope of protection since it defines the compound in terms of its function rather than its structural features. Such a definition does not refer to a specific compound or group of compounds, and instead encompasses an infinite number of compounds that may have very different chemical compositions. Similarly, the expressions 'at least' and 'around' in **claims 1, 2, 7, 14 and 16** are imprecise and fail to comply with the requirements of clarity set forth in PCT Article 6.
 - (ii) The phrases
 - 'does not include an aggregate of said cells having a size likely to cause transient or permanent dysfunctions in said patient' (**claim 1**),
 - 'are biologically, chemically or physically processed to prevent aggregate formation or specifically eliminate aggregates of said cells having a size greater than around 200 microns' (**claim 7**), and
 - 'comprises genetically modifying said cells with a nucleic acid sequence expressing an agent that prevents aggregate formation or inhibiting the expression of an agent that promotes the formation of an aggregate of said cells' (**claim 8**),define the subject matter of said claims in terms of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VIII. Certain observations on the international application

a result to be achieved rather than the technical features required to achieve said result. Such a definition leads to a lack of clarity as regards the desired scope of protection. Therefore, the claims should be reworded so as to include the technical features essential for achieving said result (PCT Article 6). For example, the feature essential for achieving the result referred to in claim 1 is present in claim 2: the size of the aggregates must not be greater than 200 microns. Such a feature should thus be added to claim 1.

- (iii) There is a discrepancy between claim 1 and claims 2 and 7. Indeed, according to the description (page 10, line 21 to page 12, line 4), the acceptable size of the aggregates is lower (50 microns) in the case of intra-arterial delivery than in the case of intravenous injection (200 microns). However, according to claim 2 or 7, the cell preparation is characterised in that it does not include an aggregate having a size greater than 200 microns, for systemic (including intra-arterial) delivery. Therefore, the cell preparation includes aggregates having a size likely to cause transient or permanent dysfunctions in the event of intra-arterial delivery. Said discrepancy is contrary to PCT Article 6.

2. The expressions 'preferably' and 'most preferably' used in **claims 2, 7, 11 and 12** have no limiting effect on the scope of these claims. In other words, the feature that follows said expressions is considered to be entirely optional (PCT Guidelines,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 99/02964

VIII. Certain observations on the international application

C-III, 4.6).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BREESE, Pierre
Breese-Majerowicz
3, avenue de l'Opéra
F-75001 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année) 19 juin 2001 (19.06.01)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire N13B2263PCT	
Demande internationale no PCT/FR99/02964	
Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 novembre 1999 (30.11.99)	

1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne:

☒ le déposant ☐ l'inventeur ☐ le mandataire ☐ le représentant commun

Nom et adresse NEUROTECH (S.A.) Parc Club Orsay 2, rue Jean Rostand Bâtiment D F-91893 Orsay FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne:

☐ la personne ☐ le nom ☒ l'adresse ☐ la nationalité ☐ le domicile

Nom et adresse NEUROTECH (S.A.) Bâtiment Génopole Industrie 4 rue Pierre Fontaine F-91000 Evry FRANCE	Nationalité (nom de l'Etat) FR	Domicile (nom de l'Etat) FR
	no de téléphone	
	no de télécopieur	
	no de téléimprimeur	

3. Observations complémentaires, le cas échéant:

4. Une copie de cette notification a été envoyée:

☒ à l'office récepteur ☐ aux offices désignés concernés
☐ à l'administration chargée de la recherche internationale ☒ aux offices élus concernés
☐ à l'administration chargée de l'examen préliminaire international ☐ autre destinataire:

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé: Jocelyne Rey-Millet
no de télécopieur (41-22) 740.14.35	no de téléphone (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 août 2000 (01.08.00)	
Demande internationale no PCT/FR99/02964	Référence du dossier du déposant ou du mandataire N13B2263PCT
Date du dépôt international (jour/mois/année) 30 novembre 1999 (30.11.99)	Date de priorité (jour/mois/année) 21 décembre 1998 (21.12.98)
Déposant TIMSIT, Serge etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

20 juin 2000 (20.06.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Kiwa Mpay

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 48/00, C12N 5/10, A61P 25/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/37111	(43) Date de publication internationale: 29 juin 2000 (29.06.00)
---	-----------	---	--

<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02964</p> <p>(22) Date de dépôt international: 30 novembre 1999 (30.11.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/16144 21 décembre 1998 (21.12.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): NEUROTECH (S.A.) [FR/FR]; Parc Club Orsay, 2, rue Jean Rostand, Bâtiment D, F-91893 Orsay (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TIMSIT, Serge [FR/FR]; 112 Ter, avenue de Suffren, F-75015 Paris (FR). QUINONERO, Jérôme [FR/FR]; 5, cours du Luzard, F-77186 Noisiel (FR).</p> <p>(74) Mandataires: BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz, 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, <u>US</u>, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, <u>LS</u>, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
---	---

(54) Title: MAMMALIAN CELL PREPARATIONS OPTIONALLY TRANSFECTED WITH A GENE CODING FOR AN ACTIVE SUBSTANCE CONTAINING SAME

(54) Titre: PRÉPARATIONS DE CELLULES DE MAMMIFÈRE ÉVENTUELLEMENT TRANSFECTÉES AVEC UN GÈNE CODANT POUR UNE SUBSTANCE ACTIVE ET LES CONTENANT

(57) Abstract

The invention concerns a mammalian cell preparation optionally transfected with at least a gene coding for an active substance capable of being administered to a subject by systemic administration. The invention is characterised in that it does not comprise aggregate of said cells having a size likely to cause temporary or permanent dysfunction in the subject. The invention also concerns pharmaceutical compositions comprising said preparation and an acceptable carrier.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet une préparation de cellules de mammifère éventuellement transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active, pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents. L'invention concerne aussi les compositions pharmaceutiques comprenant une telle préparation et un véhicule acceptable.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PREPARATIONS DE CELLULES DE MAMMIFERE EVENTUELLEMENT TRANSFECTEES AVEC UN GENE CODANT
POUR UNE SUBSTANCE ACTIVE ET LES CONTENANT

5 La présente invention concerne la
préparation de cellules de mammifères génétiquement
modifiées utiles tant comme modèle pour la recherche que
pour le diagnostic ou la thérapie génique plus
particulièrement pour le traitement des maladies du
10 système nerveux cérébral chez l'homme et éventuellement
l'animal.

Parmi les nouveaux traitements des maladies
humaines, la thérapie génique, c'est-à-dire la
15 correction *in vivo* du phénotype d'une maladie à travers
l'utilisation d'un gène fonctionnel comme agent
pharmacologique, est en plein essor. Schématiquement,
deux types de stratégie de thérapie génique peuvent être
distingués :

20 - Une stratégie dite *in vivo*, où le gène
d'intérêt est administré directement dans les cellules
de l'hôte.

 - Une stratégie dite *ex vivo* ou de thérapie
génique cellulaire, consistant à prélever et mettre en
25 culture des cellules choisies comme vecteur, à
transférer *in vitro* un ou plusieurs gènes, aussi
désignés transgènes, dans ces cellules, puis à implanter
des cellules génétiquement modifiées.

30 La thérapie génique cellulaire présente des
atouts indéniables comme la possibilité de pouvoir
vérifier, *in vitro*, préalablement à la greffe, les
effets de l'introduction et de l'expression du transgène
sur le phénotype des cellules modifiées, le nombre de
35 copies du transgène, son taux de transcription, la

quantité de protéine produite et l'effet biologique de celle-ci. La population cellulaire à greffer peut être purifiée afin d'introduire un greffon homogène tant du point de vue phénotypique, que de la production de la protéine désirée.

Parmi les cellules utilisées en thérapie génique cellulaire, il a été proposé dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No. WO93/13807 d'administrer par voie intraveineuse des cellules endothéliales non immortalisées génétiquement modifiées pour exprimer au niveau de sites angiogéniques des produits thérapeutiques.

Toutefois, il convient de rappeler que toutes les cellules endothéliales ne sont pas identiques. En effet, les cellules endothéliales de l'adulte forment une population cellulaire très hétérogène, non seulement entre les organes, mais aussi, dans un même organe, entre les vaisseaux de divers calibres. L'hétérogénéité endothéliale se caractérise par des différences morphologiques mais aussi par l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques à une ou des populations de cellules endothéliales. Par exemple dans le système nerveux central (SNC), les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux forment, en association avec les cellules astrocytaires du parenchyme cérébral, la barrière hémato-encéphalique (BHE).

La mise au point de préparation de cellules de mammifère pour la thérapie génique présente donc un problème quant à l'homogénéité et à la caractérisation desdites cellules. Une solution efficace à ce problème consiste à immortaliser les cellules. On a ainsi décrit dans l'art antérieur des lignées de cellules endothéliales cérébrales ou encore de cellules

endothéliales et épithéliales rétiniennes de mammifères immortalisées portant éventuellement un transgène utiles pour le traitement des maladies neurologiques y compris les tumeurs. On peut citer tout particulièrement les travaux de la Demanderesse rapportées dans les demandes de brevet internationales PCT publiées sous les numéros WO96/11278 et WO97/40139.

Les travaux de recherche réalisée par la demanderesse sur l'immortalisation de cellules de mammifère, plus particulièrement endothéliales cérébrales, lui ont permis d'obtenir une quantité importante, homogène et parfaitement caractérisée, de matériel à greffer ou à injecter permettant la mise en œuvre d'un procédé efficace de thérapie génique d'une maladie chez un patient. Ainsi, il a été mis en évidence dans le cadre de la présente invention, qu'après avoir été injectées dans le compartiment sanguin irriguant le SNC, les cellules endothéliales cérébrales immortalisées génétiquement modifiées, comme les cellules RBE4 n'exprimant pas de transgène, les cellules RBEZ et RBE4/GFP exprimant un transgène, sont capables de survivre et de s'intégrer dans la paroi vasculaire des micro-vaisseaux cérébraux, ainsi que dans le parenchyme cérébrale. La démonstration de l'intérêt de cette approche a demandé une maîtrise technique tant dans la mise au point des préparations cellulaires et des compositions les contenant qui ont été injectées, que dans les modes opératoires de l'injection.

En effet, les travaux de la Demanderesse concernant l'injection des cellules à des animaux lui ont permis de mettre en évidence l'effet délétère de la présence d'aggrégats cellulaires dans les compositions injectées, comme par exemple des accidents vasculaires cérébraux ou des embolies pulmonaires. Or, de manière

surprenante, l'effet délétère induit par la présence de ces agrégats cellulaires lors de l'injection ne semble pas avoir été envisagé jusqu'à ce jour. Pourtant, on a proposé dans l'art antérieur d'injecter des particules
5 conjugués ou non a un agent actif pour réaliser un diagnostic ou une thérapie. On peut citer par exemple les travaux réalisés sur des microsphères synthétiques de tailles bien définies ci-après:

- l'injection de sphères de 75 à 150 microns
10 dans les vaisseaux du coeur provoque une nécrose myocardique (Battler et al., 1993, J. Am. Coll. Cardiol., 22: 2001-2006),

- l'injection de sphères de 7 microns dans les artères de cochon, à raison de 105 particules par
15 gramme de myocarde, ne provoque pas d'effets délétères sur le tissu myocardique (Arras et al., 1998, Nature Biotechnology, 16: 159-162),

- l'injection de microsphères de 48 microns de diamètre (900 microsphères) dans la carotide interne
20 droite provoque des infarctus cérébraux dans le cortex pariéto-temporal, le corps calleux, l'hippocampe, le thalamus et le noyau lenticulaire (Miyake et al., 1993, Stroke, 24: 415-420).

On a également décrit l'injection chez
25 l'homme de microsphères d'albumines radiomarquées, d'une taille de 15 à 30 microns, dans les artères carotides commune ou interne pour détecter des régions infarctées du cerveau par des techniques de tomo-scintigraphie cérébrales (Verhas et al., 1976, J. Nucl. Med., 17: 170-
30 174) sans qu'aucun effet délétère n'ait été rapporté.

Dans le domaine de la circulation extracorporelle (CEC) où les particules générés sont susceptible d'avoir un effet délétère sur l'organisme,
il a été proposé d'utiliser des filtres de 20 microns
35 pour diminuer de 90% le nombre de particules

potentiellement délétères (Loop et al., 1976, Ann. Thorac. Surg., 21: 412-420).

Or, comme indiqué précédemment, les rares
5 travaux de l'art antérieur concernant l'injection de
cellules notamment endothéliales ne rapporte pas
d'effets délétères des compositions cellulaires
injectées dus à la présence d'agrégats cellulaires.
Ainsi, la demande de brevet internationale PCT
10 WO93/13807 décrit l'injection intraveineuse de 2×10^6
cellules endothéliales non immortalisée par la veine de
la queue de souris, et ne mentionne pas l'observation
d'effet délétère lié à la formation d'agrégats
cellulaires (Ojeifo et al., 1995, Cancer Res., 55: 2240-
15 2244). Dans l'hypothèse ou effectivement aucun effet
délétère n'a été observé, il est vraisemblable que le
faible nombre de cellules injectées chez une souris de
30 g, de l'ordre de 2×10^6 , soit 2 fois moins que ce qui
est réalisé dans le cadre de la présente invention chez
20 un rat de 300 g, n'induit pas d'effet délétère malgré
la formation d'agrégats cellulaires.

De même, les auteurs des travaux concernant
l'injection intra-artérielle (intra-fémorale) de 1 à 2×10^6
25 cellules endothéliales non immortalisée dans le
membre inférieur de rat, ne rapportent pas l'observation
d'effet délétère et ne suggère pas le problème de la
formation d'agrégats (Messina et al., 1992, Proc. Natl.
Acad. Sci., 89: 12018-12022). Bien que ces travaux ne
s'intéresse pas aux effets délétères provoqués par
30 l'injection, il convient de remarquer que le nombre de
cellules injectées est faible, de l'ordre de 50 fois
moins que ce qui est réalisé dans le cadre de la
présente invention. En outre, la cible concernée par ces
travaux est les vaisseaux du membre inférieur, dont la
35 tolérance à l'ischémie est plus grande que d'autres

5 organes. D'ailleurs, il est indiqué que les expérimentateurs ont clampé pendant une heure l'artère fémorale pour permettre une diminution du débit sanguin et ainsi favoriser l'adhésion des cellules aux parois vasculaires.

10 Le but de la présente invention est donc d'offrir une solution efficace et simple permettant d'éviter les effets délétères des injections de préparations cellulaires, et ainsi de développer leur application en médecine humaine.

15 Ce but est atteint grâce à une préparation de cellules immortalisées de mammifère éventuellement transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active, pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents.

20 De préférence, les cellules immortalisées sont non tumorigènes.

25 Les préparations de l'invention peuvent alors contenir un grand nombre de cellules, de l'ordre de 1 000 à 300 000 cellules par microlitre, permettant d'obtenir un effet biologique, en diagnostic ou thérapeutique, efficace sans induire d'effet délétère pouvant provoquer une diminution transitoire ou permanente de l'apport sanguin d'un organe, du type embolie pulmonaire, accident ischémique cérébral, 30 ischémie périphérique voire la mort.

35 Les essais réalisés dans le cadre de l'invention ont permis de caractériser la taille des agrégats susceptibles d'induire des effets délétère lors de l'injection systémique de composition contenant les cellules. Ainsi, de façon avantageuse, une préparation

de l'invention ne comprend pas d'agrégat de cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns.

5 Tous type de cellules, immortalisées ou non, peuvent entrer dans la constitution des préparations de l'invention, comme des cellules de l'endoderme, de l'épiderme ou du mésoderme, telles que cellules endothéliales cérébrales ou périphériques et leur
10 progéniteur, les cellules des plexus choroïdes, les cellules épithéliales, les cellules rétinienne pigmentaires, les épendymocytes, les tancocytes, les cellules souches et progénitrices neurales, ou encore même les cellules souches embryonnaires.

15 Parmi celles-ci, l'invention concerne plus particulièrement les cellules endothéliales et les cellules épithéliales de mammifères, avantageusement cérébrales ou rétinienne.

20 L'immortalisation des cellules peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, comme celles décrites dans les demandes de brevet PCT publiées sous les numéros WO96/11278 et WO97/40139. On préfère tout particulièrement dans le cadre de l'invention des cellules immortalisées car celles-ci
25 présentent l'avantage de la standardisation de production en grande quantité avec des critères élevés de qualité. Les cellules immortalisées présentent un caractère non tumorigène obtenu par toute méthode connue de l'homme du métier comme celles décrites dans les
30 demandes PCT citées ci-dessus.

35 L'absence d'agrégat cellulaire susceptible d'entraîner des dysfonctionnements transitoires ou permanents chez les sujets ayant reçu une préparation de l'invention, peut être obtenue par tout traitement

biologique, chimique ou physique des cellules empêchant la formation d'agrégat ou supprimant spécifiquement les agrégats desdites cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns. Après ce traitement les cellules sont avantagement mises en suspension dans un milieu permettant leur survie et ne favorisant pas leur ré-agrégation. Un tel milieu est par exemple tout milieu nutritif ne favorisant pas l'agrégation comme du PBS glucose sans calcium ni magnésium.

Un traitement biologique des cellules selon l'invention consiste par exemple à sélectionner des cellules endothéliales pour des critères particuliers d'adhésion ou à modifier génétiquement les dites cellules par une séquence d'acide nucléique exprimant un agent empêchant la formation d'agrégat ou inhibant l'expression d'un agent favorisant la formation d'agrégat desdites cellules.

Deux approches peuvent ainsi être mises en œuvre :

- la délétion de séquences codant pour des molécules d'adhésion telles que : ZO1, ZO2, E-selectine, V.E. Cadherine, ICAM-1, occludine, P-CAM, etc ..., ou
- l'introduction de séquences codant pour des molécules empêchant la formation d'agrégats, telles que des dominants négatifs des molécules d'adhésion citées ci-dessus ou codant pour des protéines leurres.

Un traitement physique des cellules selon l'invention consiste par exemple en une filtration ou un tamisage. Outre, l'exclusion d'agrégat, cette filtration ou tamisage offre l'avantage de disposer d'une population de cellules de taille homogène. Cette filtration ou tamisage est conduit de la façon suivante : Les cellules sont filtrées à l'aide de

5 filtres de blutage d'avantageusement 30 microns, puis
diluées et dissociées avec douceur par exemple par
pipetage multiple, et la suspension cellulaire est
ensuite aspirée dans une seringue. Le filtre a été
10 trempé au préalable dans du sérum physiologique stérile
puis désinfecté dans l'alcool à 100°, séché à l'air,
retrempé dans du sérum physiologique stérile. Le filtre
est ensuite placé entre l'aiguille et l'embout de la
seringue contenant les cellules. Le piston est poussé
15 délicatement de manière à avoir un écoulement goutte à
goutte des cellules diluées.

 Mais un traitement physique peut aussi être
constitué par un tri de type FACS "Fluorescent Analysis
Cell Sorting".

15 Un traitement chimique des cellules selon
l'invention consiste par exemple à trypsiniser les
cellules ou à les soumettre à l'action d'une autre
protéase.

20 Les cellules des préparations selon
l'invention peuvent ou non être transfectées avec un ou
plusieurs gènes codant pour une substance active qui est
utile pour la thérapie ou le diagnostic. On entend au
sens de la présente invention, par transfection avec un
25 ou plusieurs gènes codant pour une substance active, la
transfection des cellules par un fragment d'acide
nucléique, comme un vecteur d'expression, intégré dans
le génome ou présent dans le cytoplasme des cellules, et
capable de permettre l'expression de polypeptide(s),
30 protéine(s) ou vecteur viral constituant directement ou
indirectement une substance active. A titre d'exemples,
on peut citer les cellules endothéliales cérébrales
immortalisées transfectées avec un gène codant pour une
substance active des compositions décrite dans la
35 demande de brevet internationale PCT WO96/11278 dont

l'enseignement est intégré à la présente demande par référence.

5 L'invention se rapporte aussi à l'utilisation des préparations cellulaires précédentes pour la préparation d'un médicament destiné au diagnostic ou au traitement par thérapie génique d'une maladie chez un patient par administration par voie systémique d'une quantité suffisante desdites cellules.

10 L'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation de cellules comme décrite précédemment, en association dans ladite
15 composition avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable permettant la survie desdites cellules et ne favorisant pas leur ré-agrégation. On entend par composition pharmaceutique tant des compositions thérapeutique que de diagnostic.

20 La taille des agrégats qui ne sont pas susceptibles d'induire, lors de l'injection des compositions de l'invention chez un patient, des dysfonctionnements transitoires ou permanents sont
25 fonction de la voie d'administration. Ainsi, les injections artérielles sélective par organe vont directement dans ledit organe sans passer préalablement par un organe filtrant comme le poumon. En conséquence, pour une administration intra-artérielle, la taille
30 tolérée des agrégats est plus basse que pour une injection intra-veineuse. En effet, après injection dans une veine du pli du coude, le filtre pulmonaire peut agir et limiter la présence d'agrégats dans les autres organes. Toutefois, le risque d'effet délétère lors
35 d'une injection intra-veineuse existe puisque la

Demanderesse a observé la mort d'animaux, probablement par embolie pulmonaire, lors de l'injection de cellules endothéliales n'ayant pas subies une filtration préalable.

5 En outre, une interprétation des données de l'art antérieur et les expériences réalisées par la Demanderesse, semblent indiquer que des sphères d'une taille de plus de 40 microns sont susceptibles de présenter un effet délétère sur les tissus cibles par
10 voie intra-artérielle. En conséquence, si l'on considère qu'un amas de cellules, par exemple endothéliales, se comporte comme une sphère, il est recommandé selon l'invention d'éliminer les agrégats de taille supérieure à 30 microns. Néanmoins, les critères physiques de
15 déformabilité des cellules dans un micro-vaisseaux sont différents de ceux d'une particules synthétiques, et ce paramètre doit être pris en compte lors des traitements de cellules, comme par exemple en filtration, où l'utilisation d'un filtre de 30 microns permet
20 d'éliminer au maximum les agrégats de plus de 30 microns et, en conséquence, les cellules restantes, au moins 90%, sont des cellules isolées, dont le diamètre moyen, par exemple d'une cellule endothéliale, est de 10 microns.

25 En conséquence, l'invention concerne plus particulièrement :

 - d'une part une composition pour être administrée par voie intra-artérielle, avantageusement intra-carotidienne, chez un patient, caractérisée en ce
30 qu'elle comprend une préparation de cellules ne comprenant pas d'agrégat desdites cellules d'une taille supérieure à 50 microns et de préférence supérieure à 30 microns, et

 - d'autre part, une composition pour être
35 administrée par voie intra-veineuse, chez un sujet,

caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation de cellules ne comprenant pas d'agrégat desdites cellules d'une taille supérieure à 200 microns et de préférence supérieure à 100 microns.

5

Ces deux voies d'administration sont à prendre en considération pour la sélection des cellules injectées vers l'organe ou le tissu visé. Il est en effet recommandé de cibler un organe en injectant les compositions de l'invention dans l'artère irriguant directement l'organe ciblé.

10

A l'inverse, l'injection desdites compositions par voie intra-veineuse, nécessite d'avoir sélectionné ou conféré aux cellules des propriétés particulières leur permettant de cibler l'organe ou le tissu visé. Il peut s'agir par exemple d'une sélection de cellules endothéliales présentant des propriétés d'adhésion spécifiques ou d'une modification génique lui conférant les propriétés requises de l'organe cible.

15

20

La voie d'injection intra-artérielle, de préférence intra-carotidienne pour des applications rapportant au SNC, constitue un mode de mise en oeuvre préférée des compositions de l'invention. En effet, bien que l'injection par voie systémique semble la plus adéquate car elle permet une biodistribution la plus large possible, l'analyse de ce paramètre par la Demanderesse pour optimiser le procédé de thérapie génique mettant en oeuvre les compositions de l'invention a conduit à retenir tout préférentiellement le réseau vasculaire carotidien, qui est la voie sanguine la plus proche du SNC. Ce réseau apporte 80 % du débit sanguin cérébral nécessaire chez l'homme au bon fonctionnement du SNC et est accessible en clinique humaine mais aussi à l'expérimentateur animal.

25

30

35

Ainsi, la Demanderesse a montré dans le cadre de la présente invention que l'injection de cellules endothéliales dans la carotide est faisable en respectant le débit sanguin. Le choix de cette voie d'administration permet de minimiser au maximum les modifications du flux sanguin cérébral. En effet, le flux dans la carotide interne n'est jamais interrompu au cours de cette procédure. De plus, les analyses menées sur des animaux contrôles n'ont montré aucune atteinte parenchymateuse. Chez le rat, l'injection se fait dans la circulation carotidienne générale et se répartit à tout le territoire concerné. Chez l'homme, il est possible par les techniques de neuroradiologie interventionnelle d'injecter à l'aide d'un cathéter des vaisseaux plus petits, tels que l'artère cérébrale moyenne, l'artère cérébrale antérieure ou l'artère cérébrale postérieure voire des branches de ces artères et donc d'obtenir potentiellement un meilleur ciblage et un effet délétère moindre. Bien entendu, ces techniques sont invasives, mais elles ne le sont néanmoins pas plus qu'une artériographie qui requiert les mêmes procédures. Elles sont en revanche bien moins invasives que les gestes d'injections intraventriculaires ou intracérébrales qui permettraient la délivrance d'un produit de thérapie génique.

Dans certaines conditions, l'injection intra-carotidienne a occasionné une mortalité, et des lésions parenchymateuses. La mortalité était en générale immédiate et associée le plus souvent à des troubles respiratoires. L'explication la plus plausible est que l'injection de cellules provoquaient des embolies pulmonaires mortelles. Les lésions parenchymateuses sont survenues lorsque les quantités de cellules endothéliales étaient élevées et lorsque la suspension cellulaire n'était pas filtrée. Ces données confirment

le concept de la présente l'invention, selon lequel ce sont les agrégats cellulaires qui sont responsables des lésions parenchymateuses cérébrales et de la mortalité puisqu'elles sont minimisées après filtration. Les lésions parenchymateuses cérébrales correspondent le plus probablement à des infarctus cérébraux puisqu'elles apparaissent en hypersignal en T2 et sont localisées au territoire vasculaire de la carotide interne. La filtration a presque permis de faire disparaître tous ces effets délétères, dans de rares cas une dilatation du ventricule latéral était visible du côté de l'injection.

Comme indiqué précédemment l'absence d'agrégats dans les préparations selon l'invention permettent de disposer de compositions comprenant un nombre de cellules supérieur à ce qui était permis dans l'art antérieur. Ainsi, les composition selon l'invention, comprennent de l'ordre de 1 000 à 300 000 cellules par microlitre de composition.

Les composition selon l'invention sont tout particulièrement utiles dans le domaine de la thérapie génique, mais leur utilisation peut aussi être envisagée en matière de diagnostic.

A titre d'exemple d'applications thérapeutiques des composition de l'invention, on peut citer le traitement et/ou la prévention des maladies neurologiques dégénératives, comme le Parkinson, l'Alzheimer, le Chorée d'Huntington, etc..., des accidents vasculaires cérébraux, des cancers, des affections de l'œil, des maladies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde, des maladies immunologiques, des malformations vasculaires artérielles ou veineuses.

Parmi, les applications thérapeutiques ci-dessus, l'invention concerne plus particulièrement, une composition pharmaceutique pour être administrée par
5 voie systémique, avantageusement intra-artérielle, dans un procédé de thérapie génique d'une maladie du système nerveux central chez un sujet, caractérisée en ce que les cellules de la préparation présente dans ladite composition sont transfectées avec au moins un gène
10 codant pour une substance active dans le traitement ou la prévention d'une maladie du système nerveux.

On entend par maladie du SNC, tant le SNC lui-même que l'oeil et notamment la rétine, que les
15 vaisseaux le constituant ou l'irriguant. A titre d'exemples de maladies du SNC, on peut citer, les tumeurs cérébrales, les infarctus cérébraux, les maladies neuro-dégénératives comme celles citées précédemment, ou les malformations artério-veineuses ou
20 simplement artérielles telles que les anévrysmes artériels ou simplement veineux, les maladies oculaires et en particulier les dégénérescences rétiniennes.

En conséquence, les cellules des compositions de l'inventions sont transfectées avec un
25 gène codant pour une substance active dans le traitement et/ou la prévention des pathologies ci-dessus.

La substance codée par le gène avec lequel les cellules ont été transfectées peut être directement ou indirectement active, c'est à dire nécessiter :

- 30 - l'administration au sujet d'une deuxième substance interférant avec la première ou avec le gène codant pour celle-ci, ou
- l'exposition à une source d'énergie, ou
- la transformation par une substance
35 naturellement présente dans l'organisme, pour réaliser l'effet thérapeutique.

On peut citer notamment les substances et les gènes choisis parmi : les facteurs de croissance, les facteurs anti-apoptotiques, les gènes tueurs, les antiprotéases, les immunomodulateurs, les gènes
5 supprimeurs de tumeur, les gènes bloquant le cycle cellulaire, ou tout autre gène ou substance actif connus de l'homme du métier pour être utile dans la prévention ou le traitement des maladies du SNC.

10 Les compositions de l'invention utiles pour le traitement d'une maladie du SNC sont par exemple dosées de façon à permettre une administration de 1 million à 200 millions de cellules par kilogramme de poids du sujet à traiter.

15 Pour cette application au SNC, l'invention envisage plus particulièrement des cellules endothéliales cérébrales avantageusement immortalisées.

On connaît en effet la thérapie génique par greffe intracérébrale de cellules génétiquement
20 modifiées qui s'appliquent aux déficits neurologiques dus à une perturbation dans une zone restreinte du système nerveux central. Dans ce mode de traitement, une faible production de molécule thérapeutique, par de
25 petits greffons, peut être capable de rétablir une fonction normale. Pour pouvoir couvrir des territoires plus étendus que ceux atteints par greffe mécanique, directement dans le parenchyme cérébral, l'injection par voie systémique semble la plus adéquate. En effet, la
30 voie sanguine est la voie classique d'administration des substances thérapeutiques. Elle permet une biodistribution la plus large possible. Pour étendre cette approche d'injection à la thérapie génique cellulaire, la cellule endothéliale cérébrale apparaît
35 maintenant comme un moyen de choix.

5 Mais la thérapie génique de maladies du système nerveux central se heurte, en partie, aux problèmes posés par le nombre de types cellulaires différent composant le SNC et surtout par le nombre et la complexité de leurs connexions. De plus, la présence de la barrière hémato-encéphalique, caractéristique du SNC, rend l'accès au cerveau difficile pour le traitement des pathologies du SNC, et complique la conception de nouvelles substances thérapeutiques limitant ainsi l'utilisation de ces substances à des injections intracraniennes ou intraoculaires.

10 La demanderesse a maintenant mis en évidence que les cellules endothéliales cérébrales sont susceptibles de constituer de bons vecteurs de thérapie génique pour le système nerveux central. En effet, les cellules endothéliales cérébrales composant le réseau vasculaire cérébral sont à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral et forment la barrière hémato-encéphalique caractéristique du système nerveux central. Il a en outre été montré qu'elles sont capables de survivre et de s'implanter dans le système nerveux central après greffe intracérébrale (Quinonéro et al, Gene therapy, 1997, 4, 111-119).

25 Les travaux réalisés dans le cadre de la présente invention, ont permis de montrer à l'aide de trois techniques différentes, coloration bisbenzimidé et gènes reporter (bêta-galactosidase et GFP) que les cellules endothéliales étaient capables, d'une part de s'intégrer dans les vaisseaux et, d'autre part de survivre au sein du parenchyme en dehors de la lumière des vaisseaux. Ces résultats démontrent donc qu'il est possible d'exprimer un transgène dans le cerveau. Les potentialités thérapeutiques des compositions de l'invention visent donc plus spécifiquement les maladies du système nerveux central. Les maladies plus

particulièrement concernées par cette approche sont les tumeurs cérébrales et les infarctus cérébraux. Les maladies neuro-dégénératives peuvent être aussi concernées et en particulier la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, et la maladie de Huntington.

En conséquence, l'invention a tout particulièrement pour objet l'utilisation de cellules endothéliales cérébrales immortalisées éventuellement transfectées avec un gène codant pour une substance active pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention par thérapie génique d'une maladie du système nerveux central chez un sujet par administration par voie intra-artérielle (intra-carotidienne) audit sujet d'une quantité suffisante desdites cellules pour délivrer au niveau du système nerveux central ladite substance active.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront dans les exemples qui suivent concernant la préparation des cellules endothéliales cérébrales immortalisées transfectées avec un gène codant pour une substance active et leur utilisation dans le traitement par thérapie génique d'une maladie du système nerveux central chez un patient par administration par voie intra-artérielle. Ces exemples se réfèrent aux dessins en annexe dans lesquels :

- La figure 1 montre les lésions parenchymateuses induites par les injections de cellules endothéliales.

- La figure 2 montre l'identification des cellules RBE4 pré-marquées dans le cerveau.

- La figure 3 montre l'identification des cellules RBEZ dans le cerveau après révélation de la bêtagalactosidase nucléaire par le X-Gal.

I - Matériel et méthodes.

Les trois lignées cellulaires suivantes ont été utilisées : la lignée parentale RBE4 et deux lignées dérivées de RBE4, la lignée RBEZ et la lignée RBE4/GFP. Les lignées RBE4 et RBEZ sont décrites dans la demande de brevet internationale PCT No. WO96/11278.

La lignée RBE4 a été obtenue par la transfection de cellules endothéliales cérébrales de rat Lewis en culture primaire par un plasmide immortalisant contenant la séquence E1A de l'adénovirus de type 2. Les conditions de culture pour les cellules RBE4 et les cellules dérivées de RBE4 ont déjà été décrites précédemment (Durieu-Trautmann et al., Frontiers in CVB, 1993, 331:205-210).

Les cellules RBEZ ont été obtenues par exposition des cellules RBE4 à un vecteur rétroviral non réplicatif MFG-NB contenant le gène LacZ codant pour la bêta-galactosidase de E. Coli associée à une séquence de localisation nucléaire (nls) (Lal et al., PNAS, 1994, 91:9695-9699). Les cellules RBEZ furent ensuite sélectionnées par FACS (fluorescence-activated cell sorting) en utilisant le substrat fluorescent de la bêta-galactosidase, la fluoresceine di-bêta-galactopyranoside (Lal et al., PNAS, 1994, 91:9695-9699).

La lignée RBE4/GFP exprimant la GFP (Green Fluorescent Protein) a été obtenue après transfection des cellules RBE4 avec une construction contenant la séquence GFP sous le contrôle du promoteur de l'ubiquitine dans des cellules RBE4.

II - Préparation et marquage des cellules.

Les cellules en culture ont été dissociées par la trypsine, rincées à plusieurs reprises et mise en suspension en solution à la concentration initiale de 300 000 cellules par microlitre. La solution de dilution
5 utilisée a été soit le PBS glucose (10mMol) comprenant du calcium et du magnésium, soit le PBS glucose sans calcium ni magnésium. Pour l'injection, différentes concentrations de cellules ont été utilisées. Ces concentrations finales de cellules allaient de 10 000
10 cellules à 300 000 cellules par microlitre. Le volume total injecté a été de 500 à 1000 microlitre.

Les cellules RBE4 en culture ont été prémarquées au bisbenzimidazole (Hoechst 33342 Sigma) à la concentration de 7,5 mg/ml pendant 15 minutes à 37°C. Ce
15 colorant nucléaire fluoresce en bleu sous lumière ultraviolette du microscope à fluorescence.

III - Filtration cellulaire.

20 Dans certains cas, la solution finale a été filtrée à l'aide de filtres de blutage (Polylabo, toile à bluter nylon #87404 NY 30 HC) de 30 microns selon le protocole suivant : les cellules à la concentration initiale ont été aspirées à l'aide d'un cône jaune d'une
25 pipette P200 pour être diluées dans la solution de dilution. Les cellules sont alors diluées et dissociées avec douceur par pipetage multiple de la préparation à l'aide d'une pipette P1000 et de son cône bleu correspondant. La suspension cellulaire est ensuite
30 aspiré dans une seringue de 1 ml avec une aiguille rose de 18 gauge. Le filtre de 30 microns a été trempé au préalable dans du sérum physiologique stérile puis désinfecté dans l'alcool à 100°, séché à l'air, retrempé dans du sérum physiologique stérile. Le filtre est
35 ensuite placé entre l'aiguille et l'embout de la

seringue contenant les cellules. Le piston est poussé délicatement de manière à avoir un écoulement goutte à goutte des cellules diluées. En cas de difficultés à pousser le piston, le filtre est remplacé. Cette manœuvre de remplacement peut se faire jusqu'à 2 fois pour un ml. La viabilité des cellules a été mesurée avant et après filtration après coloration au Bleu trypan et lecture sur cellule de Malassez.

IV - Les injections intra-carotidiennes.

Des rats adultes mâles Lewis (Iffa-Credo) pesant 300 g en moyenne, ont été anesthésiés par anesthésique volatil (Isoflurane) dans un mélange oxygène et protoxyde d'azote. Une induction de 5 minutes par l'isoflurane à 5% a été suivi d'une dose de maintien de 1% pour l'opération qui durait généralement 30 à 40 minutes. L'incision des tissus cutanés et sous cutanés a été réalisé à l'aide d'un bistouri monopolaire. Les tissus musculaires ont ensuite été écartés pour permettre une exposition correcte, à gauche, de la carotide commune, la bifurcation carotidienne, la carotide externe et interne. Après dissection précautionneuse de la bifurcation carotidienne, une cautérisation des branches collatérales de l'artère carotide externe a été effectuée à l'aide d'un thermo-coagulateur bipolaire. Une thermocoagulation a aussi été effectué sur l'extrémité céphalique de l'artère carotide externe afin d'avoir un moignon cathétérisable le plus long possible. Un clip vasculaire (type SUNDT pour malformation artério-veineuse), préalablement trempé dans l'héparine diluée, est ensuite posé sur la carotide externe, proche de la bifurcation carotidienne. Une cathétérisation du moignon exclu de la circulation artérielle est réalisée à l'aide d'un cathéter à ailette

en Vialon (0,7x19 mm, Insyte-W_{TM}, Becton Dickinson) préalablement rincé par de l'héparine diluée. Une pointe de colle par de la Super-glue (Loctite) sur la collerette artérielle autour du cathéter est ensuite posée afin de solidariser le moignon et le cathéter. Le clip est ouvert pour permettre un reflux de sang artériel dans le cathéter et l'évacuation d'un éventuel caillot qui aurait pu se former. Le flux est à nouveau interrompu pour permettre l'adaptation de la seringue, contenant les cellules, à l'embout du cathéter. Le flux est ensuite rétabli et l'injection est effectuée manuellement ou à l'aide d'un pousse seringue motorisé dont la vitesse aura été préalablement réglée pour permettre une équilibration des flux entre le sang arrivant de la carotide commune et la solution venant du cathéter. L'injection se fait sous le contrôle de la loupe chirurgicale (Leica). A la fin de l'injection le moignon est cautérisé tout en vérifiant que le flux dans la carotide commune et interne soit parfaitement maintenu. Les animaux contrôles ont subi la même opération que celle décrite ci-dessus mais seul le tampon de dilution de la suspension cellulaire a été injecté, sans les cellules endothéliales.

25 V - Etude par imagerie des tissus.

Certains rats ont subi une IRM cérébrale sur un appareil de 7 Tesla (appareil Varian) voire une spectroscopie. L'imagerie IRM a été réalisée avec des coupes coronales jointives de 1 mm de tout le cerveau et des coupes coronales jointives centrées sur le cerveau antérieur (télencéphale et diencéphale, à l'exclusion du bulbe olfactif) de 500 microns. Des séquences pondérées en T2 ont été utilisées dans la majorité des cas. Dans les rares cas où les IRM étaient réalisées avant 24

heures une séquence de diffusion était rajoutée pour identifier les lésions éventuellement non visibles en séquences T2. Lorsque le cerveau ne montrait pas d'anomalies parenchymateuses à l'IRM, une spectroscopie
5 était réalisée afin de comparer les profils spectraux droits et gauche chez un même animal.

VI - Etude histologique.

10 Les animaux ont été sacrifiés à différents temps après injection. En cas de sacrifice immédiat, les différents organes prélevés (cerveau, cœur, foie, rein, œil, rate, testicule, carotide gauche) ont été immédiatement congelés dans l'isopentane refroidie par
15 l'azote liquide. En cas de sacrifices plus tardifs, les animaux ont eu une perfusion transcardiaque de 100 ml de PBS puis de 500 ml de PFA 4%. Les cerveaux prélevés ont été, post-fixés pendant 2 à 4 heures dans le PFA 4% puis cryoprotégés dans du sucrose (20 à 30%) pendant 48
20 heures. Les cerveaux ont ensuite été congelés dans l'isopentane. Tous les tissus ont été sectionnés au cryostat soit pour obtenir des coupes montées sur lame de 30 microns d'épaisseur (tous les organes) ou des coupes flottantes (le cerveau) de 40 microns
25 d'épaisseur. Les coupes flottantes étaient ensuite incubées dans une solution comprenant du X-gal pendant 3 heures 30 en cas d'utilisation de cellules RBEZ selon la technique décrite par Weis et al. (1991). Les tissus contrôles étaient toujours traités de manière
30 concomitante

VII - Résultats.

35 Quarante huit rats ont été opérés et injectés. Neuf ont eu une injection manuelle et 39 une

injection à l'aide d'un moteur électrique portable de notre conception afin d'obtenir une injection lente et régulière. Les premières opérations ont permis de confirmer l'absence de thrombose après injection de la carotide commune et interne.

1) Mortalité.

Sept rats sont morts prématurément dont 5 quelques minutes après l'injection avec semble t-il des problèmes respiratoires (n=3), des troubles neurologiques avec convulsions (n=1) ou sans cause évidente (n=1). Dans tous les cas ces morts sont survenus avant l'utilisation des filtres. Pour 6/7 rats la dose injectée était ≥ 50 millions de cellules. Aucun décès n'a été identifié dans le groupe contrôle (n=10).

2) Effets délétères tissulaires.

a) IRM et spectroscopie.

Afin d'étudier les lésions tissulaires produites par les injections intra-carotidiennes de cellules endothéliales génétiquement modifiées nous avons réalisé des IRM cérébrales et des études en spectroscopie. L'IRM cérébrale représentée aux figures 1 et 2 en annexe fournit des données morphologiques alors que la spectroscopie fournit des données chimiques. La spectroscopie a surtout été réalisée lorsque l'IRM était normale. Vingt IRM (rats #17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30 (2 fois), 31, 32, 33, 34, 35, 37, 38, 39) ont été réalisées et 6 spectroscopies. Elle était toujours normale chez les animaux contrôles (n=3)

On observe sur les photos de la figure 1, les coupes coronales IRM jointives de 1 mm, séquences pondérées en T2. A, B, C : injection de 25 millions de cellules RBEZ non filtrées ; D, E, F : injection de 25

millions de cellules RBEZ après filtration. Il convient de remarquer en A, B, C la présence d'un hypersignal cortical et putaminal gauche ipsilatéral à l'injection qui est le témoin d'un infarctus cérébral; les ventricules latéraux (hypersignaux plus intenses et homogènes que la lésion) droit et gauche sont dilatés ; la lésion provoque aussi un effet de masse avec déplacement de la ligne médiane. En D, E, F, on note l'absence d'hypersignal parenchymateux, de dilatation ventriculaire et d'effet de masse.

On observe sur les photos de la figure 2, les coupes coronales histologiques de cerveau permettant identification de cellules RBE4 préalablement marquées au bisbenzimidé et visualisées en épifluorescence par une émission dans les ultra-violets. En A-D, observation du parenchyme cérébral quelques minutes après injection intracarotidienne. En F,G, observation 7 jours après. Les flèches en B et C identifient des cellules marquées dans les micro-vaisseaux intracérébraux. Il convient de remarquer en E, la présence de cellules marquées dans les vaisseaux du plexus choroïde. La flèche en F montre un vaisseau exprimant une cellule positive. En G, la flèche montre la présence de cellules marquées dans les plexus choroïdes.

Pour deux rats, L'IRM a été réalisée 15 heures environ après l'injection des cellules, et dans ces cas des séquences de diffusion ont été réalisées en plus des séquences T2 pour être certain de bien visualiser les modifications parenchymateuses. Dans les autres cas, les IRM ont été faites entre 4 et 7 jours post-injection. Avant le protocole de filtration, 13 IRM ont été réalisées et 7 IRM après. Avant filtration, pour les rats injectés avec 10 millions (n=3) aucune lésion parenchymateuse n'a été détectée sur IRM ou

spectroscopie; néanmoins une dilatation ventriculaire était visible dans 2 des 3 cas toujours du côté gauche correspondant à la carotide injectée. Parmi les rats injectés avec 25 millions (n=4) une dilatation ventriculaire était visible dans 3 cas mais sans anomalie parenchymateuse et un rat présentait un hypersignal parenchymateux. Dans les 3 cas sans anomalie à l'IRM, 2 sur 3 avaient une spectroscopie anormale. Parmi les rats injectés avec 50 millions (n=2) les 2 avaient des lésions d'hypersignal parenchymateuses visibles en IRM.

Après application du protocole de filtration, les cerveaux des rats injectés avec 25 millions (n=2) ne présentaient pas d'hypersignal parenchymateux, mais l'un d'eux avait une dilatation ventriculaire. Parmi les cerveaux de rats injectés avec 50 millions (n=4) un seul révélait un hypersignal cortical gauche. Ce rat avait néanmoins été préalablement traité par mannitol afin d'ouvrir la barrière hémato-encéphalique. Un autre, parmi les 3 restants, avait une dilatation du ventricule latéral ipsilatérale à l'injection.

b) Histologie des tissus injectés.

Les colorations des coupes par un colorant de Nissl (cresyl violet) n'ont pas révélé de lésions paranchymateuses évidentes après injection de cellules filtrées. Par contre, avant filtration, l'injection de cellules provoquait des anomalies histologiques. Ces anomalies étaient d'une part, des pertes cellulaires avec perte régionale de la lamination des différentes couches du cerveau et d'autre part, une hypercellularité, témoin d'une réaction inflammatoire microgliale et astrocytaire.

3) Localisations des cellules.

a) Identification des cellules RBE4 prémarquées au Bisbenzimidé.

5 Quelques minutes après injection de cellules endothéliales RBE4 marquées par le Bisbenzimidé, les cellules étaient clairement identifiées dans les micro-vaisseaux du cerveau, comme montré sur la figure 3. Sept
10 jours après l'injection, quelques cellules sont encore visibles, intégrées dans des vaisseaux sanguins mais aussi au sein du parenchyme.

 La figure 3 montre en A, une cellule RBEZ est incorporée à la lumière d'un vaisseau intra-cérébral. En B, une cellule RBEZ en position
15 extraluminale intra-parenchymateuse. Il convient de remarquer en C (agrandissement de B) la bordure du vaisseau (flèches noires).

b) Identification des cellules RBEZ par la coloration au X-Gal.

20 Des greffes systémiques de cellules RBEZ permettent de mettre en évidence, 7 jours post-injection, des cellules dont le noyau est bleu, soit intégrées dans des vaisseaux, soit dans le parenchyme à
25 distance de la paroi vasculaire. La localisation nucléaire du marquage X-gal a été confirmée par un marquage des coupes à l'aide du bisbenzimidé (Hoechst), un colorant du noyau. Lorsque le marquage était effectivement nucléaire le marquage fluorescent Hoechst
30 était masqué par la coloration au X-gal. En revanche lorsque le marquage était cytoplasmique le marquage nucléaire était clairement visible témoignant d'une expression de la bêta-galactosidase endogène (non montré) caractéristiques des cellules macrophagiques.

c) Identification des cellules GFP par épifluorescence.

Des cellules exprimant le GFP étaient
visibles sous forme d'une coloration fluorescente verte
à 1, 3 et 5 jours après injection de cellules
endothéliales GFP. Le marquage vert de la GFP était
visible à la fois dans le cytoplasme et le noyau de la
cellule comme a permis de le confirmer les contre-
colorations du noyau à l'aide du Bisbenzimidé. Deux
types de morphologie de cellules endothéliales étaient
visibles. D'une part, des cellules rondes isolées qui
semblaient en position endovasculaires et d'autre part,
des cellules allongées souvent par groupe de 2 au sein
du parenchyme.

15

REVENDICATIONS

5 1) Préparation de cellules de mammifère éventuellement transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active, pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents.

10

2) Préparation de cellules de mammifère selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns.

15

3) Préparation de cellules de mammifère selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que lesdites cellules sont immortalisées.

20

4) Préparation de cellules de mammifère selon l'une quelconque des revendication 1 à 3, caractérisée en ce que les cellules sont non tumorigènes.

25

5) Préparation de cellules de mammifère selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdites cellules sont choisies dans le groupe comprenant les cellules endothéliales et les cellules épithéliales de mammifères.

30

6) Préparation de cellules de mammifère selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce

que lesdites cellules sont choisies dans le groupe comprenant les cellules cérébrales et rétiniennes.

5 7) Préparation de cellules de mammifère
selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,
caractérisée en ce que lesdites cellules ont subies un
traitement biologique, chimique ou physique empêchant la
formation d'agrégat ou supprimant spécifiquement les
10 agrégats desdites cellules d'une taille supérieure à
environ 200 microns, de préférence supérieure à 50
microns et tout préférentiellement supérieure à 30
microns, puis mises en suspension dans un milieu
permettant la survie desdites cellules et ne favorisant
pas leur ré-agrégation.

15 8) Préparation de cellules de mammifère
selon la revendication 7, caractérisée en ce que le
traitement biologique consiste à modifier génétiquement
les dites cellules par une séquence d'acide nucléique
20 exprimant un agent empêchant la formation d'agrégat ou
inhibant l'expression d'un agent favorisant la formation
d'agrégat desdites cellules.

25 9) Préparation de cellules de mammifère
selon la revendication 7, caractérisée en ce que le
traitement physique consiste en une filtration ou un
tamisage.

30 10) Composition pharmaceutique pour être
administrée par voie systémique chez un sujet,
caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation de
cellules selon l'une quelconque des revendications 1 à
9, en association dans ladite composition avec un
véhicule pharmaceutiquement acceptable permettant la

survie desdites cellules et ne favorisant pas leur ré-agrégation.

5 11) Composition pour être administrée par
voie intra-artérielle, avantageusement intra-
carotidienne, chez un patient, selon la revendication
10, caractérisée en ce qu'elle comprend une préparation
de cellules ne comprenant pas d'agrégat desdites
10 cellules d'une taille supérieure à 50 microns et de
préférence supérieure à 30 microns.

12) Composition pour être administrée par
voie intra-veineuse, chez un sujet, selon la
revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend
15 une préparation de cellules ne comprenant pas d'agrégat
desdites cellules d'une taille supérieure à 200 microns
et de préférence supérieure à 100 microns.

13) Composition selon l'une quelconque des
20 revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle
comprend de l'ordre de 1 000 à 300 000 cellules par
microlitre de composition.

14) Composition pharmaceutique pour être
25 administrée par voie systémique dans un procédé de
thérapie génique d'une maladie du système nerveux
central chez un sujet, selon l'une des revendications 10
à 13, caractérisée en ce que les cellules sont
transfectées avec au moins un gène codant pour une
30 substance active dans le traitement ou la prévention
d'une maladie du système nerveux.

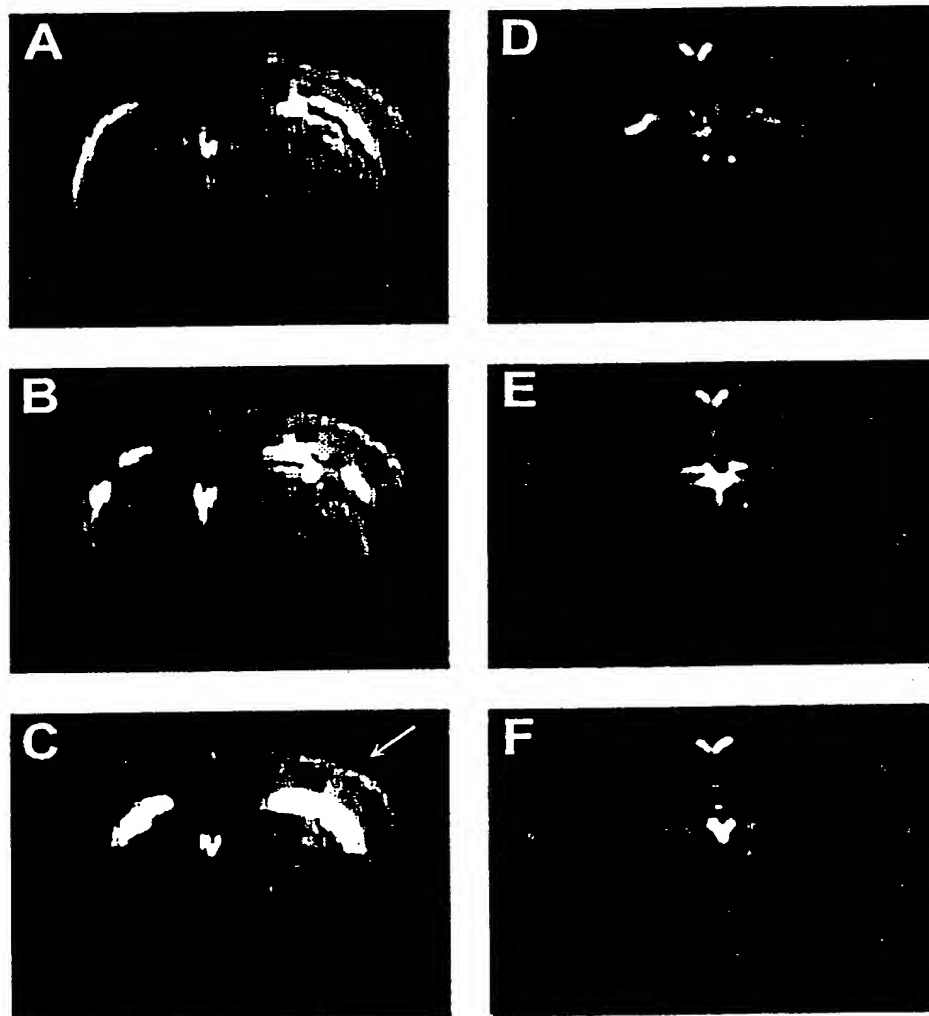
15) Composition selon la revendication 14,
caractérisée en ce que la substance ou le gène actif
35 dans le traitement ou la prévention d'une maladie du

5 système nerveux est choisie parmi les facteurs de croissance, les facteurs anti-apoptotiques, les gènes tueurs, les antiprotéases, les immunomodulateurs, les gènes suppresseurs de tumeur, les gènes bloquant le cycle cellulaire.

10 16) Composition selon l'une des revendications 14 à 15, caractérisée en ce qu'elle est dosée de façon à permettre une administration de 1 million à 200 millions de cellules de mammifère immortalisées transfectées avec au moins un gène codant pour une substance active par kilogramme de poids du sujet à traiter.

1/4

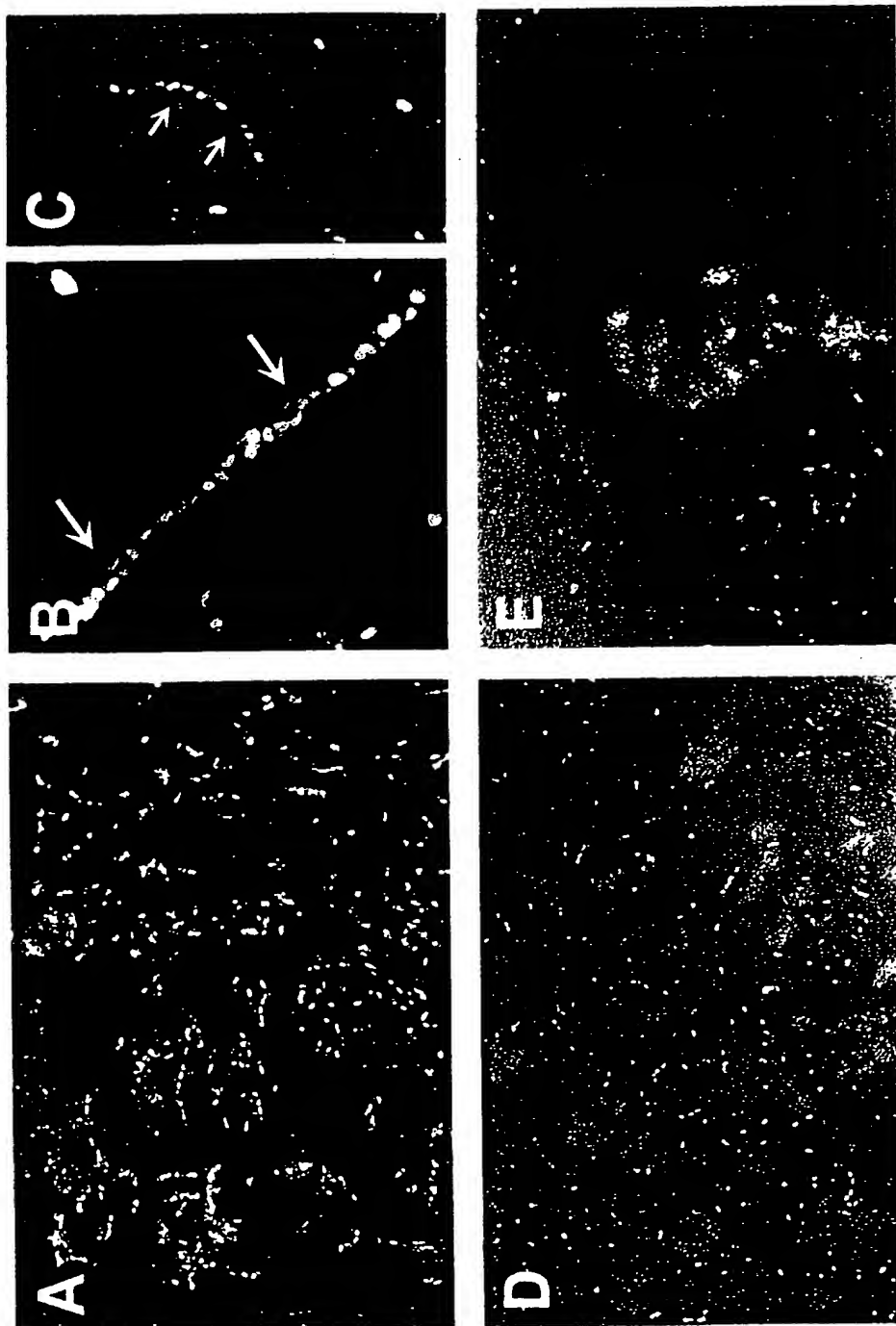
Fig.1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2/4

Fig.2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/4

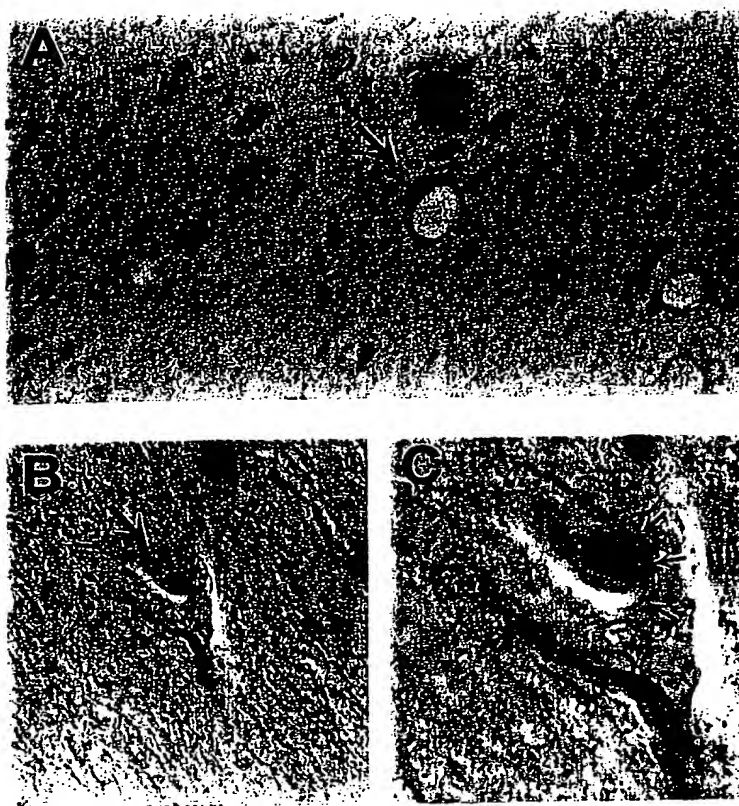
Fig.2 suite



THIS PAGE BLANK (USPTO)

4/4

Fig.3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.

PCT/FR 99/02964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K48/00 C12N5/10 A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 40139 A (NEUROTECH SA ; ADAMSON PETER (GB); GREENWOOD JOHN (GB); LUND RAYMON) 30 October 1997 (1997-10-30) cited in the application	
A	WO 96 11278 A (CHAUVEROT NATHALIE ; TCHELINGERIAN JEAN LEON (FR); ADIM (FR); ROUX F) 18 April 1996 (1996-04-18) cited in the application	

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 March 2000

Date of mailing of the international search report

13/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patenstaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Rempp, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02964

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9740139 A	30-10-1997	FR 2747690 A	24-10-1997
		AU 2704197 A	12-11-1997
		CA 2225520 A	30-10-1997
		EP 0833895 A	08-04-1998
		JP 11508142 T	21-07-1999
		NZ 329360 A	28-05-1999
WO 9611278 A	18-04-1996	FR 2726005 A	26-04-1996
		AU 3657595 A	02-05-1996
		CA 2202066 A	18-04-1996
		EP 0787197 A	06-08-1997
		JP 10507074 T	14-07-1998
		NZ 293994 A	25-02-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den. : Internationale No

PCT/FR 99/02964

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 A61K48/00 C12N5/10 A61P25/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 97 40139 A (NEUROTECH SA ; ADAMSON PETER (GB); GREENWOOD JOHN (GB); LUND RAYMON) 30 octobre 1997 (1997-10-30) cité dans la demande	
A	WO 96 11278 A (CHAVEROT NATHALIE ; TCHELINGERIAN JEAN LEON (FR); ADIM (FR); ROUX F) 18 avril 1996 (1996-04-18) cité dans la demande	

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 mars 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

13/03/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Rempp, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/02964

Document brevet cité au rapport de recherche	Date d publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
W0 9740139 A	30-10-1997	FR 2747690 A	24-10-1997
		AU 2704197 A	12-11-1997
		CA 2225520 A	30-10-1997
		EP 0833895 A	08-04-1998
		JP 11508142 T	21-07-1999
		NZ 329360 A	28-05-1999
W0 9611278 A	18-04-1996	FR 2726005 A	26-04-1996
		AU 3657595 A	02-05-1996
		CA 2202066 A	18-04-1996
		EP 0787197 A	06-08-1997
		JP 10507074 T	14-07-1998
		NZ 293994 A	25-02-1999

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

BREESE, PIERRE
BREESE-MAJEROWICZ
3, Avenue de l'Opéra
75001 Paris
FRANCE

PCT

**NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE
INTERNATIONAL
(règle 71.1 du PCT)**

Date d'expédition
(jour/mois/année) 23.03.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
N13B2263PCT

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR99/02964

Date du dépôt international (jour/mois/année)
30/11/1999

Date de priorité (jour/mois/année)
21/12/1998

Déposant
NEUROTECH (S.A.) et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international

Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d



Fonctionnaire autorisé

Guerin, A



THIS PAGE BLANK (USPTO)

TRAITÉ DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire N13B2263PCT	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR99/02964	Date du dépôt international (jour/mois/année) 30/11/1999	Date de priorité (jour/mois/année) 21/12/1998
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K48/00		
Déposant NEUROTECH (S.A.) et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 20/06/2000	Date d'achèvement du présent rapport 23.03.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Bladier, C 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR99/02964

I. Base du rapport

1. Ce rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17).*) :

Description, pages:

1-28 version initiale

Revendications, N°:

1-16 version initiale

Dessins, feuilles:

1/4-4/4 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR99/02964

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 2, 7-9, 11-16 Non : Revendications 1, 3-6, 10
Activité inventive	Oui : Revendications 2, 7-9, 11-13 Non : Revendications 1, 3-6, 10, 14-16
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-16 Non : Revendications

- 2. Citations et explications**
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Re Item V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Documents cités

La présente notification fait mention du document D1 cité dans le rapport de recherche.

D1: WO 96 11278 A (1996-04-18)

La présente notification fait également mention du document D2 cité dans la présente demande (voir copie jointe).

D2: WO 93 13807 A1 (1993-07-22)

Nouveauté et activité inventive - Articles 33(2) et (3) PCT

1. La présente demande concerne une préparation de cellules de mammifère, immortalisées, non tumorigènes, cérébrales ou rétiniennes, endothéliales ou épithéliales, pour être administrée par voie systémique chez un sujet, caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents. La présente demande concerne également une composition pharmaceutique contenant lesdites cellules, cette composition pouvant être utilisée dans un procédé de thérapie génique d'une maladie du système nerveux central.
2. Le document D1 a pour objet des lignées cellulaires endothéliales cérébrales de mammifère, immortalisées, non tumorigènes, ainsi que des compositions comprenant lesdites lignées, pouvant être avantageusement administrées chez un sujet par voie intra-veineuse ou intra-artérielle (voir résumé, page 1 lignes 5-11, page 3 lignes 1-25, page 6 lignes 7-17). Aucun effet délétère desdites lignées n'est mentionné (voir page 5 lignes 22-26). En conséquence le document D1 anticipe l'objet des **revendications 1, 3-6 et 10** (Article 33(2) PCT). De plus, le document D1 mentionne l'utilisation desdites lignées cellulaires pour des applications thérapeutiques, notamment le traitement des maladies neurologiques

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(voir résumé lignes 2-3, page 1 lignes 8-11, page 5 lignes 26-29). Ce document est donc également préjudiciable à l'activité inventive des **revendications 14-16** (Article 33(3) PCT).

Le document D2 décrit, comme mentionné dans la présente demande (page 5 lignes 10-14), l'injection intra-veineuse par la veine de la queue de souris de cellules endothéliales de souris non tumorigènes, génétiquement modifiées, et ne mentionne pas l'observation d'effet délétère lié à la formation d'agrégats cellulaires (voir résumé, page 11 lignes 11-14, , page 12 lignes 18-24, page 19 lignes 9-14, revendications 1-3). En conséquence, le document D2 anticipe l'objet des **revendications 1, 4, 5 et 10**.

3. Il est à noter que les objections ci-dessus sont dues au fait que la formulation de la revendication 1 est imprécise et ne contient pas la caractéristique technique essentielle à l'invention qui permettrait de délimiter l'invention de façon non ambiguë par rapport à l'état de la technique du point de vue de la nouveauté (voir objection point VIII paragraphe 1.ii).

Dans le cas où la Demanderesse modifierait la revendication 1 en incorporant la caractéristique technique essentielle à l'invention, comme proposé au point VIII paragraphe 1.ii), l'objet de cette revendication serait alors considéré comme nouveau et inventif conformément à l'Article 33(2) et (3) PCT:

En effet, le problème technique sous-jacent à la présente demande est de fournir une préparation cellulaire de mammifère contenant un grand nombre de cellules et n'induisant pas, après administration par voie systémique chez un sujet, de dysfonctionnements transitoires ou permanents chez ledit sujet. La solution à ce problème proposée par la présente demande est d'utiliser une préparation cellulaire caractérisée en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns.

Aucun des documents de l'art antérieur mis à la disposition de l'IPEA ne mentionne d'effet délétère de compositions cellulaires administrées par voie systémique du à la présence d'agrégats cellulaires ni ne suggère l'utilisation d'une

THIS PAGE BLANK (USPTO)

préparation cellulaire comprenant des agrégats cellulaires ayant une taille limitée. Par conséquent, l'IPEA est d'avis qu'il ne serait pas évident pour l'homme du métier au vu de l'art antérieur disponible, de penser à utiliser une préparation cellulaire se caractérisant en ce qu'elle ne comprend pas d'agrégat cellulaire d'une taille supérieure à environ 200 microns, de préférence supérieure à 50 microns et tout préférentiellement supérieure à 30 microns pour résoudre le problème posé. Par conséquent, l'objet de la présente demande impliquerait une activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.

Concernant le point VIII

Observations relatives à la demande internationale

1. Les revendications contiennent de nombreuses définitions qui ne sont pas admissibles d'après l'Article 6 PCT:
 - i) L'expression 'un gène codant pour une substance active' dans **les revendications 1, 14 et 16** est imprécise et engendre un doute quant à l'étendue de la protection demandée car elle définit le composé par sa fonction et non par ses caractéristiques structurelles. Ce mode de définition ne fait pas référence à un composé ou groupe de composés précis mais englobe un nombre infini de composés pouvant avoir des compositions chimiques très différentes. De même, les adverbes 'au moins' et 'environ' dans **les revendications 1, 2, 7, 14 et 16** sont imprécis et non conformes aux conditions de clarté requises par l'Article 6 PCT.
 - ii) Les formulations
 - 'ne comprend pas d'agrégat desdites cellules d'une taille susceptible d'entraîner chez ledit patient des dysfonctionnements transitoires ou permanents' (**revendication 1**)
 - 'ont subi un traitement biologique, chimique ou physique empêchant la formation d'agrégat ou supprimant spécifiquement les agrégats desdites cellules d'une taille supérieure à environ 200 microns' (**revendication 7**)
 - 'consiste à modifier génétiquement lesdites cellules par une séquence d'acide nucléique exprimant un agent empêchant la formation d'agrégat ou inhibant l'expression d'un agent favorisant la formation d'agrégat desdites cellules' (**revendication 8**)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

définissent l'objet desdites revendications par un résultat à atteindre et non par les caractéristiques techniques nécessaires pour obtenir ce résultat. Ce type de définition introduit un manque de clarté en ce qui concerne l'étendue de la protection demandée. Par conséquent, les revendications devraient être reformulées en insérant les caractéristiques techniques essentielles pour arriver au dit résultat (Article 6 PCT). Par exemple, la caractéristique essentielle pour atteindre le résultat recherché dans la revendication 1 est contenue dans la revendication 2: la taille des agrégats ne doit pas être supérieure à 200 microns. Une telle caractéristique devrait donc être insérée dans la revendication 1.

- iii) Il existe une discordance entre la **revendication 1** et les **revendications 2, 7**. En effet, selon la description (page 10 ligne 21 à page 12 ligne 4), pour une administration par voie intra-artérielle, la taille tolérée des agrégats est plus basse (50 microns) que pour une injection intra-veineuse (200 microns). Or, d'après les revendications 2 ou 7, la préparation de cellules se caractérise en ce qu'elles ne compend pas d'agrégat d'une taille supérieure à 200 microns, pour être administrée par voie systématique (qui inclue la voie intra-artérielle). En conséquence, la préparation cellulaire comprend des agrégats d'une taille susceptible d'entraîner des dysfonctionnements transitoires ou permanents si une administration par voie intra-artérielle est réalisée. Une telle discordance n'est pas conforme à l'Article 6 PCT.
2. Les expressions 'de préférence' et 'tout préférentiellement' utilisées dans les **revendications 2, 7, 11 et 12** n'ont aucun effet limitatif sur la portée de ces revendications. En d'autres termes, la caractéristique qui suit est considérée comme entièrement facultative (Directives PCT C-III-4.6).

THIS PAGE BLANK (USPTO)